

(N)

DERWENT-ACC- 1990-080967  
NO:

DERWENT- 199844  
WEEK:

COPYRIGHT 2007 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Angiotensin converting enzyme inhibitor - contg. peptide having C-terminated aminoacid  
sequence of Leucine-Proline-Proline

PATENT-ASSIGNEE: AGENCY OF IND SCI & TECHNOLOGY[AGEN] , SHOWA SANGYO CO[SHOS]

PRIORITY-DATA: 1988JP-0185468 (July 27, 1988)

**PATENT-FAMILY:**

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES	MAIN-IPC
JP 02036127 A	February 6, 1990	N/A	009	N/A
JP 2805032 B2	September 30, 1998	N/A	005	A61K 038/00

**APPLICATION-DATA:**

PUB-NO	APPL-DESCRIPTOR	APPL-NO	APPL-DATE
JP 02036127A	N/A	1988JP-0185468	July 27, 1988
JP 2805032B2	N/A	1988JP-0185468	July 27, 1988
JP 2805032B2	Previous Publ.	JP 2036127	N/A

INT-CL A61K037/64, A61K038/00, C07K005/08, C07K005/083, C07K007/06, C07K014/425,  
(IPC): C07K099/00, C12N009/99, C12P021/06

RELATED-ACC-NO: 1998-489457

ABSTRACTED-PUB-NO: JP 02036127A

**BASIC-ABSTRACT:**

An angiotensin converting enzyme inhibitor contg. as the active component at least one peptide having the C-terminated amino acid sequence of Leu-Pro-Pro and having a degree of amino acid polymerisation of 3-5 prepd. by hydrolysing gamma-zein with thermolysin (I) and then enzymatically or with an acid.

**USE/ADVANTAGE** - Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor can be prepd. from corn protein in a large amount in a low price and has a hypotensive activity.

In an example, 0.5 g zein/25 ml distilled water was ultrafiltered to remove impurities. NaOH was added and heated at 100 deg.C for 30 min. to modify it. It was ultrafiltered and reacted with 18 mg (I) at 37 deg.C for 40 hrs. and ultrafiltered and neutralised and concd. and fed to Sephadex LH-20 column and eluted with water. Val-His-Leu-Pro-Pro-Pro (II) was recovered, and purified by Radial PAC C-8 and SepRAK C-18 (waters Inc.). Leu-Pro-Pro-pro (III) was prepd. from (II) by reacting with leucine amino peptidase. Leu-Pro-Pro (IV) was prepd. by hydrolysing (III). Val-His-Leu-Pro-Pro (V) was prepd. from (II) in a same amanner as above. ACE inhibitions are examined. Concns. for 50% inhibition of (V), (IV) and (II) are resp. 18, 9.6 and 200 microns.

**CHOSEN-DRAWING:** Dwg.0/0

**TITLE-TERMS:** ANGIOTENSIN CONVERT ENZYME INHIBIT CONTAIN PEPTIDE TERMINATE AMINOACID SEQUENCE LEUCINE PROLINE PROLINE

**DERWENT-CLASS:** B04 D16

**CPI-CODES:** B04-B04A4; B04-C01; B12-F05A; D05-C11;

**CHEMICAL-CODES:** Chemical Indexing M1 \*01\* Fragmentation Code F012 F014 F423 F521 H1 H100 H181 J0 J011 J1 J111 J171 M280 M312 M314 M315 M320 M321 M333 M340 M342 M343 M349 M371 M381 M391 M417 M423 M510 M520 M521 M530 M540 M620 M710 M903 P526 P616 Q233 V803 V814 V901 V912 V913 V914 V921 Registry Numbers 1327U 0502U

**SECONDARY-ACC-NO:**

**CPI Secondary Accession Numbers:** C1990-035763

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 02-036127

(43)Date of publication of application : 06.02.1990

(51)Int.Cl.

A61K 37/64  
C12P 21/06  
// C07K 5/08  
C07K 5/10  
C07K 7/06  
C12N 9/99  
C07K 99:00

(21)Application number : 63-185468

(71)Applicant : AGENCY OF IND SCIENCE & TECHNOL  
SHOWA SANGYO CO LTD

(22)Date of filing : 27.07.1988

(72)Inventor : MARUYAMA SUSUMU  
TANAKA HIDEOKI  
TOMIZUKA NOBORU  
MITSUYOSHI SHINSUKE  
FUKUI FUMIO

## (54) ANGIOTENSINASE INHIBITOR

(57)Abstract:

**PURPOSE:** To obtain an angiotensinase inhibitor utilizable as a drug or food useful for the prevention and remedy of hypertension by hydrolyzing  $\gamma$ -zein with thermolysin and further hydrolyzing with an enzyme or acid.

**CONSTITUTION:** The objective peptide of formula (Val)-(His)-Leu-Pro-Pro having a C-terminal amino sequence of Leu-Pro-Pro and an amino acid polymerization degree of 3-5 can be produced by (1) hydrolyzing  $\gamma$ -zein with thermolysin, (2) subjecting the obtained enzyme liquid to ultrafiltration to recover the filtrate containing low-molecular component, (3) neutralizing with an alkaline aqueous solution, (4) subjecting to column chromatography to obtain a solution containing Val-His-Leu-Pro-Pro-Pro, (5) hydrolyzing with leucine aminopeptidase as necessary and (6) hydrolyzing with a carboxy peptidase C or with an acid under mild condition.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the  
examiner's decision of rejection or application]

converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

## ⑫ 公開特許公報(A)

平2-36127

⑬ Int. Cl.

A 61 K 37/64  
C 12 P 21/06

識別記号

A B E

庁内整理番号

8615-4C  
6712-4B※

⑭ 公開 平成2年(1990)2月6日

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全9頁)

⑮ 発明の名称 アンジオテンシン変換酵素阻害剤

⑯ 特 願 昭63-185468

⑰ 出 願 昭63(1988)7月27日

⑱ 発 明 者 丸 山 進 茨城県つくば市東1丁目1番3号 工業技術院微生物工業技術研究所内  
 ⑱ 発 明 者 田 中 秀 興 茨城県つくば市東1丁目1番3号 工業技術院微生物工業技術研究所内  
 ⑱ 発 明 者 富 塚 登 茨城県つくば市東1丁目1番3号 工業技術院微生物工業技術研究所内  
 ⑲ 出 願 人 工 業 技 術 院 長 東京都千代田区霞が関1丁目3番1号  
 ⑳ 復 代 理 人 弁 理 士 坂 口 昇 造  
 ㉑ 出 願 人 昭 和 産 業 株 式 有 限 公 司 東京都千代田区内神田2丁目2番1号  
 ㉒ 代 理 人 弁 理 士 坂 口 昇 造

最終頁に続く

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

アンジオテンシン変換酵素阻害剤

## 2. 特許請求の範囲

1. γ-ゼインをサーモライシンで加水分解し、ついでさらに酵素的にまたは酸で加水分解することによって得られる、C末端アミノ酸配列がLeu-Pro-Proであるアミノ酸重合度3～5のペプチドの少なくとも1種を有効成分として含有するアンジオテンシン変換酵素阻害剤。

2. サーモライシンまたはババインによるゼインの加水分解物であって分子量が200～5,000のペプチド含有量が固形物基準で30重量%以上である加水分解物を有効成分として含有するアンジオテンシン変換酵素阻害剤。

## 3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明はアンジオテンシン変換酵素阻害剤に関し、特に近年増加の傾向にあり対策が望まれている高血圧症の予防及び治療に有用な医薬品又は食

品に利用できることが期待されるアンジオテンシン変換酵素阻害剤に関するものである。

(従来の技術)

高血圧症の発症にはレニン-アンジオテンシン系が深くかかわりを有していることがよく知られているが、このレニン-アンジオテンシン系にはアンジオテンシン変換酵素(EC3.4.15.1,以下ACEとも言う)が重要な役割を果たしている。この場合ACEは、肝で分泌されるアンジオテンシノーゲンが腎で産生される酵素レニンにより分解されたアンジオテンシンⅠ(Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu)に対して作用し、このものをアンジオテンシンⅡ(Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe)に変換させる。そして、このアンジオテンシンⅡは血管壁平滑筋を収縮させて血圧を高め、さらに副腎皮質に作用してアルドステロンの分泌を促進させるなどの作用を有する。また、血漿に存在する酵素カリクレインはキニノーゲンと呼ばれる蛋白質を分解し、血管を拡張させ降圧させるブラジキニンを産生するが、このブラジキニンは

ACE の作用により分解され、不活性化されてしまう。このように、ACE は一方で昇圧性ペプチド（アンジオテンシンⅡ）を生じさせるとともに、他方で降圧性ペプチド（ブラジキニン）を分解し、結果として、血圧を上昇の方向に進める。したがってこの酵素活性を抑制することによって血圧上昇を防ぐこと（降圧）が可能である。

ACE の活性阻害物質としては蛇毒より得られた数種のペプチド性阻害剤を初めとして、カプトプリル(D-2-メチル-3-メルカプトプロパノイル-L-プロリン)などの合成物質が多数知られており、このうちカプトプリルは経口降圧剤として既に実用に供されている。また、近年、微生物あるいは種々の食品中にもACE阻害物質が見出され、降圧剤としての実用化が検討されている。

また、牛乳カゼインのトリプシン加水分解由来のACE阻害物質を単離し、あるいはさらにペプチターゼで処理し、これを血圧降下剤として用いることが提案されている（特公昭60-23085号、同60-23086号、同60-23087号、特開昭61-36226号、

同61-36227号）。

また最近では、魚類タンパク質または大豆タンパク質のバチルス属細菌由来のセリンプロテアーゼ、バチルス属細菌由来の金属プロテアーゼまたは植物由来のチオールプロテアーゼによる加水分解物を血圧降下剤として用いることが提案されている（特開昭62-169732号）。

一方、とうもろこしタンパク質はプロラミンを50～60%、グルテリンを35～40%含み、主成分であるプロラミンはゼイン(zein)と呼ばれる。ゼインは $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ の3種に分けられる(J. Cereal Sci. 5, 117(1987))。 $\gamma$ -ゼイン中にはVal-His-Leu-Pro-Pro-Proを基本単位とする繰り返し構造が含まれている(Nucleic Acids Res. 13 (5), 1493 (1985))。

（発明が解決しようとする課題）

新規有用な血圧降下剤ひいてはアンジオテンシン変換酵素阻害剤は常に求められている。また医薬品としてのみならず、日常の摂取を通して高血圧等の種々の症状の予防等を図る機能性食品も

とめられる昨今である。

従って本発明は優れたアンジオテンシン変換酵素阻害作用ならびに血圧降下作用を有し、安全性が極めて高く、医薬品としてのみならず機能性食品としても使用可能な特定のオリゴペプチド系アンジオテンシン変換酵素阻害剤を提供することを目的とする。また本発明は、優れたアンジオテンシン変換酵素阻害作用を有し、安全性が極めて高く、安価かつ大量に供給でき、医薬品としてのみならず機能性食品としても有用なアンジオテンシン変換酵素阻害剤を提供することをも目的とする。（課題を解決するための手段）

本発明者らはACE阻害活性を有する物質を種々検索した結果、安価で最も一般的な食品用タンパク質であるとうもろこしタンパク質中の $\gamma$ -ゼインを特定のプロテアーゼで加水分解して得られる一定のペプチド、またはゼインの特定のプロテアーゼによる一定の加水分解物がアンジオテンシン変換酵素阻害活性を有すること、及び該ペプチドまたは加水分解物を用いることによって上記課

題を解決できることを見出した。

すなわち請求項1記載の本発明は $\gamma$ -ゼインをサーモライシンで加水分解し、ついでさらに酵素的にまたは酸で加水分解することによって得られる、C末端アミノ酸配列がLeu-Pro-Proであるアミノ酸重合度3～5のペプチドの少なくとも1種を含有するアンジオテンシン変換酵素阻害剤を提供し、請求項2記載の本発明はサーモライシンまたはパバインによるゼインの加水分解物であって分子量が200～5,000のペプチド含有量が固形物基準で30重量%以上である加水分解物を有効成分とするアンジオテンシン変換酵素阻害剤を提供する。

以下、本発明を分説する。

請求項1記載の本発明に使用する $\gamma$ -ゼインとしてはとうもろこし、またはコーンスターチの製造過程で得られるとうもろこしタンパク質から分離したゼインタンパク質から、常法に従って分離することができる（例えば Plant Physiol., 80, 623(1986)）。また参考例1に $\gamma$ -ゼインの調製例

を示す。

請求項1記載の発明における加水分解は次の工程によって行われる。

a)  $\gamma$ -ゼインはまずサーモライシン加水分解に付してVal-His-Leu-Pro-Pro-Proを生成させる。すなわちまず $\gamma$ -ゼインを水酸化ナトリウム水溶液等のアルカリ溶液に溶解し、限外濾過により可溶化した低分子夾雑物を除去する。ついで必要に応じてpH 10 ~ 12、温度 80 ~ 100℃で 5分 ~ 1時間処理する等して $\gamma$ -ゼインを変性させ、サーモライシンを働きやすくする。この際低分子化した画分は限外濾過により除く。

ついでpHを塩酸等で中性近辺に調整し、 $\text{Ca}^{2+}$ 含有緩衝液でpHを6 ~ 9に調整し、温度を30 ~ 80℃に保ち、サーモライシンを加え1 ~ 40時間酵素反応を行わせる。緩衝液としては0.005 ~ 0.01M  $\text{CaCl}_2$ 含有 0.05M トリス塩酸緩衝液(pH8 ~ 8.5)等が好適に用いられる。サーモライシンの使用量は基質100重量部に対し0.1 ~ 10重量部が適当である。反応は例えば塩酸等の酸を添加してpH 3以下

ある。

反応は例えば100℃で5分間加熱するなどして終了させる。反応終了液から目的物の単離精製はカラムクロマトグラフィー、例えば逆相系HPLCなどによって行うことができる。目的物質の追跡はa)の場合と同様合成ペプチドのHPLC溶出パターンの比較によって行うことができる。

c) 次にVal-His-Leu-Pro-Pro-Pro、His-Leu-Pro-Pro-ProまたはLeu-Pro-Pro-ProをカルボキシペプチダーゼCで加水分解するか、温和な酸加水分解に付することにより各C末端Proを1つ外す。この酵素反応は通常pH 4 ~ 7の緩衝液中30 ~ 60℃で1 ~ 24時間行う。緩衝液としては0.1M クエン酸緩衝液等を使用する。カルボキシペプチダーゼCの使用量は基質100重量部に対し0.1 ~ 10重量部が適当である。反応は例えば100℃で5分間加熱する等して終了させる。

酸加水分解は通常、濃度0.1 ~ 6規定の塩酸等の酸を用い、温度80 ~ 120℃で5 ~ 120分行う。反応は水酸化ナトリウム水溶液等で中和すること

下として酵素を失活させることにより終了させる。

反応後酵素液を限外濾過に付して通過する低分子含有濾液を回収する。水酸化ナトリウム等のアルカリ水溶液で濾液を中和後、濃縮し、カラムクロマトグラフィー、例えばセファデックスLB-20カラムクロマトグラフィーに付し、各画分のHPLCによる溶出パターンを合成Val-His-Leu-Pro-Pro-Proのそれと比較することにより、Val-His-Leu-Pro-Pro-Pro含有溶液を得る。このものはカラムクロマトグラフィー、例えばSP-トロボール650S陽イオン交換クロマトグラフィー、逆相系HPLCなどによりさらに精製することができる。

b) 次にVal-His-Leu-Pro-Pro-Proをロイシンアミノペプチダーゼで加水分解してHis-Leu-Pro-Pro-ProまたはLeu-Pro-Pro-Proを生成させる。この酵素反応は通常、pH 6 ~ 9の緩衝液中、30 ~ 60℃で1 ~ 24時間行う。緩衝液としては0.05M  $\text{MgCl}_2$ 含有0.1M トリス塩酸(pH8.6)等を使用する。ロイシンアミノペプチダーゼの使用量は基質100重量部に対し、0.1 ~ 10重量部が適当で

により終了させる。

いずれの場合も反応終了液から目的物の単離精製はカラムクロマトグラフィー、例えば逆相系HPLCなどによって行うことができる。目的物質の追跡はa)の場合と同様合成ペプチドのHPLC溶出パターンの比較によって行うことができる。

なお、上記b)の工程は必要に応じ行う。またb)とc)の工程を共に行う場合いずれを先に行ってもよい。

上記によって得られる請求項1記載のアミノ酸重合度3 ~ 5のペプチドはACE阻害活性を示す。これらのペプチドをACE阻害剤として使用する場合、これらのペプチドは単独で含有されていてもよく、また任意の割合の混合物として含有されていてもよく、さらに加水分解物由来の他のペプチド、アミノ酸をマイナー成分として含有してもよい。

請求項1のペプチドはそのまま、または通常少なくとも1つの製剤補助剤と製剤組成物にして使用する。

請求項1のペプチドは非経口的（すなわち、静脈注射、直腸投与等）または経口的にヒトをはじめとする哺乳類に投与し、各投与方法に適した形態に製剤することができる。

注射剤としての製剤形態は、通常滅菌水溶液を包含する。上記形態の製剤はまた緩衝剤・pH調節剤（リン酸水素ナトリウム、クエン酸等）、等張化剤（塩化ナトリウム、グルコース等）、保存剤（パラオキシ安息香酸メチル、p-ヒドロキシ安息香酸プロピル等）等の水以外の他の製薬補助剤を含有することができる。該製剤は細菌保持フィルターを通す濾過、組成物への殺菌剤の混入、組成物の照射や加熱によって滅菌することができる。該製剤はまた殺菌固体組成物として製造し、用時滅菌水等に溶解して使用することもできる。

経口投与剤は胃腸器官による吸収に適した形に製剤する。錠剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、粉末剤は常用の製薬補助剤、例えば結合剤（シロップ、アラビアゴム、ゼラチン、ソルビット、トラガカント、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシ

プロピルセルロース等）、賦形剤（ラクトース、シュガー、コーンスターチ、リン酸カルシウム、ソルビット、グリシン等）、滑沢剤（ステアリン酸マグネシウム、タルク、ポリエチレングリコール、シリカ等）、崩壊剤（ポテトスターチ、カルボキシメチルセルロース等）、湿潤剤（ラウリル硫酸ナトリウム等）を包含することができる。錠剤は常法によりコーティングすることができる。経口液剤は水溶液等にしたたり、ドライプロダクトにすることができる。そのような経口液剤は常用の添加剤例えば保存剤（p-ヒドロキシ安息香酸メチルもしくはプロピル、ソルビン酸等）を包含していてもよい。

請求項1のACE阻害剤中の本ペプチドの量は種々かえることができるが、通常1～100%（w/w）が適当である。本ACE阻害剤の投与量は有効成分として0.5～500mg/kg/dayが適当である。なお、請求項1のペプチドの急性毒性はいずれもLD<sub>50</sub>（ラット、経口投与）>5g/kgである。

また、請求項1のペプチドは多量に摂取しても

生体に悪影響を与えない利点を有することから、そのまま、または種々の栄養分等を加えて、もしくはは飲食品中に含有せしめて血圧降下作用、高血圧予防の機能をもたせた機能性食品、健康食品として食してもよい。すなわち、例えば各種ビタミン類、ミネラル類等の栄養分を加えて、例えば栄養ドリンク、豆乳、スープ等の液状の食品や各種形状の固形食品、さらには粉末状としてそのままあるいは各種食品へ添加して用いることもできる。

かかる機能性食品、健康食品としての請求項1のACE阻害剤中の本ペプチドの含有量、及び摂取量は上記製剤におけると同様でよい。

次に請求項2記載の本発明について説明する。この発明に使用するゼインはα-ゼイン、β-ゼイン、γ-ゼイン各単独でもよいし、2また3の混合物であってもよい。これらのゼインは市販のものでもよいし、またコーンスターチの製造過程で得られるとうもろこしタンパク質から分離したゼイン、またはそれから公知の手法で分離した（Plant Physiol., 80, 623 (1986)）各α-、β-、

γ-ゼインであってもよい。参考例2にβ-ゼインの製造例を示す。

請求項2の発明で使用される酵素はサーモライシンまたはババインである。

次に加水分解の条件としては、分子量200～5,000のペプチドを全加水分解固形物に対する割合で30重量%（以下%と略称する。）以上含むような加水分解物が得られる条件であれば特に限定はない。

具体的には、基質濃度は反応時に攪拌混合ができる範囲内であればいずれでも良いが、攪拌が容易なタンパク質濃度2～20%の範囲で行うのが好ましい。酵素の添加量は使用する酵素の力価により異なるが通常はタンパク質当たり0.01%以上、好ましくは、0.1～10%が適当である。反応のpH、温度は各々の酵素により異なるが、各々の至適pH、至適温度付近を用いればよく、サーモライシンではpH6～9、温度30～70℃、ババインではpH5～8、温度30～60℃が適当である。反応時間は酵素の種類、添加量、反応温度、反応pHによ



って異なるため一定ではないが、通常は1～40時間程度である。

加水分解反応の停止は、反応混合液の加熱あるいはクエン酸、リンゴ酸等の有機酸または塩酸、リン酸等の無機酸または水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等のアルカリの添加によるpHの変化などによる酵素の失活、限外濾過膜等による酵素の濾別など公知の方法に従って行うことができる。

反応混合液はそのまま優れたACE阻害作用を有するが、遠心分離または濾過等公知の固液分離法により固形分を除去して用いることもできる。固形分除去したかまたは除去しない該加水分解物は液体としてそのまま使用することもでき、又必要に応じて脱色、脱塩等の操作を行った後、噴霧乾燥あるいは凍結乾燥等の公知の乾燥法によって粉末として使用することもできる。上記した操作によって分子量が200～5,000のペプチドの含有量が全加水分解固形物基準で30重量%以上であるゼイン(α、β、γ-ゼイン各単独、またはその任意の混合物)の加水分解物が得られる。なお、

上述したところから明らかなように本加水分解物は固体状であっても液状であってもよい。

請求項2の加水分解物は限外濾過、ゲル濾過等により高分子量部分、及びまたは低分子量部分(アミノ酸等)をカットしたものであってもよい。例えばα-ゼインについての本加水分解終了液を分画分子量10,000の膜を用いて限外濾過して得られる膜通過画分は分子量5,000を超えるペプチド、及び分子量200未満のペプチド及びアミノ酸を実質上殆ど含有しないが、かかる画分またはその精製物、粉末化物も請求項2のACE阻害剤の有効成分として用いることができる。

請求項2の加水分解物はそのまま製剤組成物として、または少なくとも1つの製剤補助剤と製剤組成物にして使用する。請求項2の加水分解物は非経口的(すなわち、静脈注射、直腸投与等)または経口的にヒトをはじめとする哺乳類に投与し、各投与方法に通じた形態に製剤することができる。注射剤及び経口投与剤の製造、製剤補助剤例は請求項1の発明と同様でよい。

請求項2のACE阻害剤中の加水分解物の量は種々かえることができるが、通常加水分解物(固形物)として1～100%が適当である。本ACE阻害剤の投与量は加水分解物(固形物)として0.5～500mg/kg/dayが適当である。本加水分解物は毒性を有さない。例えば実施例3、4で得られる加水分解物(高分子量カット)の急性毒性はいずれもLD<sub>50</sub>(ラット、経口投与) > 5g/kgである。

また、請求項2の加水分解物は多量に摂取しても生体に悪影響を与えない利点を有することから、請求項1のペプチドと同様、そのまま、または種々の栄養分等を加えて、もしくは飲食品中に含有せしめて血圧降下作用、高血圧予防の機能をもたせた機能食品、健康食品として食してもよい。かかる食品としての請求項2のACE阻害剤中の本加水分解物の含有量及び摂取量は製剤におけると同様でよい。

#### (実施例)

次に本発明を実施例により説明する。

実施例中 %は重量%を示す。

#### 実施例 1 各オリゴペプチドの調製とACE阻害活性

##### a) Val-His-Leu-Pro-Pro-Pro の調製

γ-ゼイン0.5gを蒸留水25mlに分散させ、1N NaOHでpH12に調整しγ-ゼインを溶解させた。ついで限外濾過膜としてアミコン社PM-10(分画分子量10,000)を用いる限外濾過に付し、可溶化した低分子夾雑物を除去した。内液にpH12のNaOHを加え全容25mlとし、100℃で30分加熱しγ-ゼインを変性させた。この処理で低分子化した画分を除去するため再度上記と同じ限外濾過に付し、内液に蒸留水を加え全容25mlとし、さらに1N HClで中性にした。

全容に対し0.25容の0.05N CaCl<sub>2</sub>含有0.25N トリスHCl緩衝液(pH8.5)を加え、37℃に保った後、サーモライシン(シグマ社)18mgを加えた。40時間後、1N HClでpH1.7に調整して反応を停止させ、前記と同じ限外濾過に付して通過する低分子を回収した。これを1N NaOHで中和後、濃縮し濃縮液をセファデックスLH-20のカラムに添加し蒸留水

で溶出させた(溶出条件: カラム高さ70cm、内径1.6cm、試料添加量2ml、流速33ml/hr)。

各画分の少量を用いて HPLC による溶出パターンを調べ、合成 Val-His-Leu-Pro-Pro-Pro が示す溶出位置と同位置のピークを持つ画分を回収した(HPLC の溶出条件: カラム ウォータース社 Radial PAK C-8, 10  $\mu$ m, 試料添加量5  $\mu$ l、流速1 ml/min、溶出リン酸緩衝液(10mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 50mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , pH3.0): アセトニトリル=2:3、検出 UV210nm)。

この画分を5mM 酢酸緩衝液(pH4.0)で平衡化したSPトヨパール6505カラムに添加し、0~0.3M NaCl の直線濃度勾配で溶出し、HPLCにて合成Val-His-Leu-Pro-Pro-Pro と同位置に溶出されるピークをもつ画分を回収した(SP-トヨパール溶出条件: カラム高さ20cm、内径1.6cm、流速100ml/hr、溶出5mM 酢酸緩衝液(pH4.0)を含む0~0.3M NaCl、HPLCの溶出条件は前記と同じ)。

回収した画分を濃縮後、HPLCに付して合成Val-His-Leu-Pro-Pro-Pro と同位置のピークのみを分

取し、pH2 のHCl で洗浄した逆相シリカゲルカラム SepPAK C-18 (ウォータース社)に吸着させ、pH2 のHCl で混在する塩を除去した後、メタノールで溶出させ、アミノ酸分析を行った(分取時のHPLC溶出条件: 試料添加量のみ25  $\mu$ lで他は最初の場合の条件と同じ)。上記でアミノ酸分析は試料を6N HClに溶解し、真空下110℃で24時間加熱後アミノ酸分析計により行った。

この結果 Leuを1としたモル比がVal 1.3、His 1.2、Leu 1、Pro 3.1となり、Val-His-Leu-Pro-Pro-Pro が回収できた。

また、質量分析の結果は659(M+1)<sup>+</sup>であり、上記ペプチドの予想分子量と一致した。

#### b) Leu-Pro-Pro-Proの調製

ロイシンアミノペプチターゼ(ベーリンガーマンハイム山之内社)(5mg/ml液状)を0.05M NaCl、含有0.1Mトリス塩酸(pH8.6)800  $\mu$ lに溶解し酵素液とした。

300  $\mu$ M Val-His-Leu-Pro-Pro-Pro 50  $\mu$ lと酵素液200  $\mu$ lを混合し、37℃で23時間反応させた。

にして得た。

#### e) ACE阻害活性の測定

以上のようにして得た各ペプチドのACE阻害活性を以下のごとく測定した。すなわちまず、5gのラビットラングアセトンパウダーを50mlの0.1Mホウ酸ナトリウム緩衝液(pH 8.3)に溶かし、40,000G、40分の条件下で遠心処理し、その上澄液をさらに上記緩衝液で5倍に希釈して、アンジオテンシン変換酵素液を得た。

各ペプチド溶液を試験管に0.03ml入れ、これに基質として、0.25mlのヒブリンヒスチジルロイシン(最終濃度5mM、NaCl 300mM含む)を添加し、ついで上記アンジオテンシン変換酵素液0.1mlを加え、37℃で30分間反応させた。その後、1N塩酸0.25mlを添加して反応を停止させた後、1.5 mlの酢酸エチルを加え、酢酸エチル中に抽出されたヒブリン酸の228nmでの吸収値を測定し、これを酵素活性とした。なお、この条件で本発明阻害剤を含まない場合の228nmの吸収値はほぼ0.35であった。

反応後、反応液よりHPLCで合成Leu-Pro-Pro-Pro、と同位置に溶出されるピークを回収しアミノ酸分析を行った(HPLC 溶出条件: 使用するリン酸緩衝液のpHを2.5としたこと、及び試料添加量を10  $\mu$ lとした以外は最初の場合の条件と同じ)。

この結果Leuを1としたモル比がVal 0.16、Leu 1、His 0.19、Pro 2.51となり、Leu-Pro-Pro-Pro が回収できた。

#### c) Leu-Pro-Pro の調製

6.3mM Leu-Pro-Pro-Pro 200  $\mu$ lと12N HCl 200  $\mu$ lを混合し、100℃で10分加水分解反応に服せしめた。ついでHPLCによる溶出で合成 Leu-Pro-Pro と同位置のピーク(3.18nm)をもつ画分が回収できた。

(溶出条件: カラム メルク社 Lichrosorb RP-Select B 5  $\mu$ m、流速1 ml/min、溶出 リン酸緩衝液(pH2.5):アセトニトリル=5:1、検出UV 210nm)。

#### d) Val-His-Leu-Pro-Pro の調製

Val-His-Leu-Pro-Pro-Pro より上記 c) と同様

このような実験を複数行い、阻害率を次の式より算出した。

$$\text{阻害率} = \frac{A - B}{A} \times 100 (\%)$$

A: 阻害剤を含まない場合の 228nm 吸収値

B: 阻害剤添加の場合の 228nm 吸収値

そして、阻害率50%のときの阻害剤濃度 1.0 を求めた。

結果は以下の通りであった。

	1.0 (μM)	備考
Val-His-Leu-Pro-Pro	18	本発明
Leu-Pro-Pro	9.6	"
Val-His-Leu-Pro-Pro-Pro	200	比較例
Leu-Pro-Pro-Pro (1mMで33%阻害)		"

#### 実施例 2 Leu-Pro-Pro の血圧降下作用

体重200gのWistar系雄性ラット(日本ラット(株)、1群5匹)をウレタン1.5g/kg腹腔内投与により麻酔し、常法に従って総動脈圧をトランスデューサー(SCK-590, 日本光電(株))を介して連続的に記録した。下腿静脈より、生理食塩水

に溶解したLeu-Pro-Proを投与し、その5、15、25および35分後にアンジオテンシンI(ヒト配列、シグマ社)100ng/kgを繰り返し投与して、前後の平均血圧の変化を測定した。対照としては、生理食塩水を投与したものを用いた。

結果を表-1に示す。

本ペプチドは投与5分後のアンジオテンシンIによる昇圧を効果的に抑制し、その作用は35分後にもなお持続していた。

表-1

試験群	血圧上昇(ΔmmHg)			
	5分後	15分後	25分後	35分後
対照(生理食塩水投与群)	21±3 22±1	27±6 22±8	29±11 23±6	32±8 22±5
Leu-Pro-Pro 40mg/kg投与群	16±6 15±5	24±5 23±5	25±4 21±7	23±3 22±4
Leu-Pro-Pro 125mg/kg投与群	9±1 9±3	15±6 14±5	16±5 16±4	17±4 16±3

上段: 最高血圧 下段: 平均血圧

#### 実施例 3

α-ゼイン(シグマ社)を2%濃度になるよう

に50mMトリス塩酸(pH8.0)に加え、トリプシン、キモトリプシン(ともにP-Lバイオケミカルズ社)、ズブチリシンカールスバーク(シグマ社)またはババイン(シグマ社)を0.2%濃度になるように加え、37℃で20時間酵素反応を行った。

別に5mM塩化カルシウム含有50mMトリス塩酸(pH8.0)と0.2%サーモライシン(シグマ社)との組み合わせ、0.057N塩酸と0.2%ペプシン(P-Lバイオケミカルズ社)との組み合わせ、または10mMホウ酸塩(pH12.0)との0.2%アルカリプロテアーゼ(東洋紡(株))との組み合わせをそれぞれ用いて上記と同様に酵素反応を行った。

酵素反応液を限外濾過に付し(ミリポア社モルカット使用、分画分子量10,000)、膜を通過した画分を回収した。

次に上記各画分について実施例1と同様の方法によってACE阻害活性を測定した。またサーモライシン及びババインの場合の上記各画分について分子量200~5,000のペプチドの割合及び加水分解前のα-ゼイン全量に対する分子量200~

5,000のペプチドの割合を以下の方法により調べた。

すなわち、セファデックスG-25(ファイン)のカラム(13mm × 820mm)に予め分子量既知の標準品を流し(溶媒 0.1M酢酸アンモニウム)分子量と溶出位置の関係を決定した。用いた標準品及びその分子量は次の通りである。

リボスクレアーゼ A	13,700
アプロチニン	6,500
グイノルフィン A	2,147
バソトラシン	1,411
オキシトシン	1,007
グリシルグリシルアラニン	203

次に同一条件下に前記膜通過画分を流して得たゲル濾過パターンから、膜通過画分はサーモライシン及びババインのうちいずれの酵素を使用した場合にも実質上分子量200~5,000のペプチドからなっており、5,000を超えるペプチド、200未満のペプチド、アミノ酸を殆ど含有していないことが明らかになった。次にサーモライシン及びバ

バインについて得られた膜通過画分の窒素量(マイクロケルダール法による)を分解前の $\alpha$ -ゼインの窒素量で除することにより原料 $\alpha$ -ゼインに対する分子量200~5,000のペプチドの割合を求めた。

得られた結果を表-2にまとめて示す。

表-2

$\alpha$ -ゼイン加水分解物(膜通過画分)のACE阻害活性と分子量200~5,000のペプチドの割合

	1.0 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	分子量200~ 5,000のペプチ ドの割合(固形 分基準、 $\alpha$ -ゼ イン基準)	備考
サーモライシン	30	64	本発明
ババイン	70	34	"
ベブシン	130		比較例
ズブチリシン	180		"
キモトリブシン	170		"
アルカリプロテアーゼ	170		"
トリブシン	190		"

#### 実施例 4

#### 実施例 6 錠剤

Leu-Pro-Pro	7 部
ヒドロキシプロピルセルロース	1 部
ラクトース	10.9部
ポテトスターチ	1 部
ステアリン酸マグネシウム	0.1部

ヒドロキシプロピルセルロース1部を含む60%エタノール水溶液20部を調製し、本ペプチド7部およびラクトース10.9部を加えて十分に混練した後、減圧下で乾燥し、得られた乾燥物にポテトスターチ1部およびステアリン酸マグネシウム0.1部を加えて混和し、打錠機により製錠する。

#### 実施例 7 静脈注射剤

実施例3で得られた膜通過画分(凍結乾燥品)を20~100倍(容積/重量)の滅菌生理食塩水に溶解し、無菌的にフィルター(孔径0.45 $\mu\text{m}$ )で濾過した濾液を注射剤とする。

$\beta$ -ゼイン(参考例2で調製のもの)または $\gamma$ -ゼイン(参考例1で調製のもの)を2%濃度になるように5mM塩化カルシウム含有50mMトリス塩酸(pH 8.0)に加え、サーモライシン(シグマ社)を0.2%濃度になるように加え、37℃で20時間酵素反応を行った。

得られた酵素反応液を実施例3と同様に限外濾過に付して得た画分を用いて実施例3と同様に求めた該画分のACE阻害活性(I<sub>50</sub>)は $\beta$ -ゼインでは50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $\gamma$ -ゼインでは110 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、及び各原料ゼインに対する分子量200~5,000のペプチドの割合(固形分基準)は $\beta$ -ゼインでは75%、 $\gamma$ -ゼインでは58%であった。

#### 実施例 5 静脈注射剤

Leu-Pro-Proを20~100倍(容積/重量)の滅菌生理食塩水に溶解し、無菌的にフィルター(孔径0.45 $\mu\text{m}$ )で濾過した濾液を注射剤とする。

実施例3で得られた膜通過画分 (凍結乾燥品)	5 部
ヒドロキシプロピルセルロース	1 部
ラクトース	12.9部
ポテトスターチ	1 部
ステアリン酸マグネシウム	0.1部

ヒドロキシプロピルセルロース1部を含む60%エタノール水溶液20部を調製し、本加水分解物5部およびラクトース12.9部を加えて十分に混練した後、減圧下で乾燥し、得られた乾燥物にポテトスターチ1部およびステアリン酸マグネシウム0.1部を加えて混和し、打錠機により製錠する。

#### 参考例 1 $\gamma$ -ゼインの調製

Esenの方法(J. Cereal Sci. 5, 117 (1987))に従って行った。粉碎とうもろこし(普通種デントコーン)100gに1% 2-メルカプトエタノールを含む60% イソプロピルアルコール水5倍量を加え、60℃で2時間攪拌することにより全ゼイン画分を抽出した。混合物を3,000Gで10分遠心分離し、上清に等容の蒸留水及び0.02容の3M酢酸ナトリウム水溶液を加え、少量の酢酸でpHを6に合わせ4℃で

一晚静置して $\alpha$ および $\beta$ -ゼインを沈澱させた。ついで3,000Gで10分遠心分離し、上清を凍結乾燥し、乾燥物を少量の蒸留水に分散させ、透析チューブを用いて蒸留水に対して透析し、ついで凍結乾燥して、淡黄色粉末として $\gamma$ -ゼイン0.4gを得た。

#### 参考例 2 $\beta$ -ゼインの調製

Esenの方法(参考例1と同文献)に準じて行った。

参考例1で沈澱させた $\alpha$ 及び $\beta$ -ゼイン混合物を回収し、2% 2-メルカプトエタノールを含む60%イソプロピルアルコール水を5倍量加え、 $\alpha$ 及び $\beta$ -ゼイン両者とも再溶解せしめた後、3倍量のイソプロピルアルコールを加え $\alpha$ -ゼインのみ沈澱させた。3000Gで10分遠心分離して上清を回収し、以下 $\gamma$ -ゼインと同様に透析、凍結乾燥を経て淡黄色粉末の $\beta$ -ゼイン0.6gを得た。

(発明の効果)

請求項1記載の本発明によれば優れたACE阻害作用ならびに血圧降下作用を有するACE阻害

剤が提供される。

請求項2記載の本発明によれば最も一般的な食品タンパク質であるとうもろこしタンパク質中のゼインからACE阻害剤を安価かつ大量に提供することが可能である。

また請求項1及び2記載のACE阻害剤は共に食品タンパク質由来のため大量に摂取しても極めて安全性が高く、従って副作用を示すこともない。

またゼインの加水分解物を含有するACE阻害剤は特開昭62-169732号に記載の魚類タンパク質または大豆タンパク質の加水分解物を含有するACE阻害剤に比し、より高いACE阻害活性を示す。

特許出願人 工業技術院長

昭和産業株式会社

代理人 弁理士 坂口昇造



第1頁の続き

⑤Int. Cl. <sup>3</sup>	識別記号	庁内整理番号
// C 07 K 5/08	ZNA Z	8318-4H
5/10		8318-4H
7/06		8318-4H
C 12 N 9/99		7823-4B
C 07 K 99:00		

⑫発明者 三吉	新介	千葉県船橋市日の出2丁目20番2号 昭産日の出寮
⑫発明者 福井	史生	千葉県成田市中台1丁目2番117号